

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580338

研究課題名（和文） てんかん～不安障害・睡眠障害に至る神経疾患分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） Clarification of molecular mechanisms that are involved in development of epilepsy and anxiety.

研究代表者

加藤 啓子 (KATO KEIKO)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：90252684

研究成果の概要（和文）： α 2,3-シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)は、てんかん、うつ・不安障害、睡眠障害に関与する。本研究では、ST3Gal IV 遺伝子欠損マウスを利用することで、こうした神経精神疾患に至る分子メカニズムの解明を目指した。結果、ST3Gal IV が、てんかん発作閾値に作用する脳成長ホルモンの発現を制御すると共に、脂質代謝系やステロイドホルモン産生に影響することがわかった。

研究成果の概要（英文）： α 2,3-sialyltransferase (ST3Gal IV) is involved in developments of epilepsy, anxiety, depression, and sleep disorder. In this study, I aimed at the elucidation of the molecular mechanisms of these neuropsychiatric symptoms by using mice deficient for ST3Gal IV gene. Finally, we found that ST3Gal IV controlled the expression level of brain growth hormone that enhances progression of epileptic seizures and was associated with brain lipid metabolism system and production of steroid hormone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：生体情報

1. 研究開始当初の背景

ヒト難治てんかんの5割を占める側頭葉てんかんのモデルマウスを用いた研究より、てんかん発症の誘導時に、成長ホルモンと α 2,3-シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)が著しい発現上昇を示すことを見つけていた。そこで、これら分子とてんかん発症との関連性を明らかにするために研究を進めた。まず、成長ホルモンが脳で発現し、てんかん発作の閾値を下げることを明らかにした。一方、 α 2,3-

シアル酸転移酵素遺伝子欠損マウスを作成すると共に、成長ホルモンとの関連性を解析し、てんかん発症機構の解明を目指した。すると、 α 2,3-シアル酸転移酵素遺伝子欠損(ST3GalIV-KO)マウスが、てんかん刺激に応答し発作を示さないこと、不安症状、睡眠障害、そしてメスにおける性周期不順等を示すことがわかってきていた。またST3GalIV-KOマウスが成長ホルモンの発現低下に基づく成長遅延を示したことから、シ

アル酸転移酵素が、成長ホルモンの発現調節に影響することがわかった。こうした背景より、 $\alpha 2,3$ -シアル酸転移酵素と成長ホルモンとの脳での関連性が示唆された。

2. 研究の目的

成長ホルモンシグナル系の上流に位置する $\alpha 2,3$ -シアル酸転移酵素が作用するシアル酸付加・標的分子を同定し、てんかん発症からうつ・不安障害・睡眠障害に至る神経疾患メカニズムの分子シグナルの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 10種のレクチン(MAA, MAM, ECA, SNA, ABA, PNA, BPA, WGA, AAL, EEL)を用いて、レクチン組織化学法とレクチン沈降法により、ST3Gal IV-KO マウス脳と野生型マウス脳間における、糖たんぱく質のレクチン親和性の違いをスクリーニングした。その結果、反応性の異なる2種レクチンがわかったので、これらレクチンを用いたレクチン沈降法を実施した。質量分析により、ST3Gal IV-KO マウス脳特異的に検出できたタンパク質の同定を試みた。

(2) 幾つかのチャンネル受容体抗体を用いたウエスタンブロッティングと免疫沈降法により、KO マウス脳と野生型脳間で、量と分子量の差を検討した。

(3) ジーンチップアレイにより、ST3Gal IV-KO マウスと野生型マウスの発現を比較した。

(4) 成長ホルモンが脂質代謝に関わることから、食餌中の脂質を変えることで、不安様行動への影響を観察した。不安様行動を観察するために、恐怖条件付け試験を実施した。

(5) 周産期分娩異常を示すことから、分娩直前のメスマウスの血中卵胞刺激ホルモン、黄体形成ホルモン、エストロジェン、プロゲステロンを測定した。

4. 研究成果

(1) ABA (*Agaricus bisporus*, mushroom) , と PNA (*Arachis hypogaea*, peanut)を用いたレクチン沈降法により、ST3Gal IV-KO マウスにのみ検出できたバンドが確認されたことから、質量分析により同定を試みたところ、KO マウス特異的に脳特異的スペクトリンを検出された。しかしながら、脳特異的スペクトリン抗体を用いた免疫沈降法を実施したところ、KO マウスと野生型間で分子量の差及び量に差は見られなかった。

(2) ナトリウムチャンネル α サブユニット量が、KO マウスで著しく亢進した。しかしながら、KO マウスと野生型脳から調整した TritonX-100 膜画分を用いた免疫沈降を実施したところ、ナトリウムチャンネル α サブユニ

ット量に差が見られなかったことから、ナトリウムチャンネルの局在の変化が示唆された。(3) ジーンチップアレイにより、脳成長ホルモン量が、ST3Gal IV-KO マウスの脳で著しく減少していたので、リアルタイム RT-PCR 法により確認した。その結果、ST3Gal IV-KO マウス脳における成長ホルモン量と Igf1mRNA 量が、それぞれ 1/3 と 1/2 にそれぞれ減少していた。成長ホルモンは、てんかん誘導後著しく神経細胞で発現上昇し、てんかん発症の閾値を下げることでわかっており、てんかん発症と不安様症状との間で、ST3Gal IV は、成長ホルモンの発現の増減に影響することがわかった。

(4) ST3Gal IV-KO マウスは、手がかり(音)恐怖条件付け試験を受けると、野生型マウスに比べ音刺激に対して著しいすくみ行動を示す。一方で、文脈的恐怖条件付け試験に対する影響はない。手がかり(音)恐怖条件付け試験において、野生型マウスは、飼料中の脂質の種類や量を変えても、すくみ行動に変化を示さなかったが、ST3Gal IV-KO マウスでは、すくみ行動を著しく改善する脂質があった。また、文脈的恐怖条件付け試験では、野生型、ST3Gal IV-KO マウス共にすくみ時間を延長する脂質があり、ST3Gal IV-KO マウスが、重篤な症状を示した。

成長ホルモンと受容体拮抗薬をそれぞれ海馬内に投与した後、海馬より脂質粗画分を調整し、薄層クロマトグラフィーにより、リン脂質と糖脂質組成の変化を観察した。その結果、成長ホルモンで消失するリン脂質スポットと、拮抗薬で消失するリン脂質スポットと糖脂質スポットをそれぞれ検出した。今後、これらスポットを質量分析により決定する必要がある。また、脳成長ホルモン量を減少する ST3Gal IV-KO マウスの海馬内の脂質粗画分を調整し、リン脂質組成及び糖脂質組成を野生型マウスと比較する必要がある。

(5) 分娩直前の血中のエストロジェン量は、野生型、ST3Gal IV-KO マウス共に同じであったが、分娩時に低下するプロゲステロン量が、ST3Gal IV-KO マウスでは、高レベルを示した。分娩直前に分泌量が上昇する卵胞刺激ホルモンと黄体形成ホルモンは、ST3Gal IV-KO マウスでは、低下したままであった。

本申請内容と平行し、ST3Gal IV-KO マウスの行動解析をおこなっていた。音を手がかりとした恐怖条件付け試験により、野生型に比べ著しいすくみ行動を示したことから、音に対する驚愕試験を試した。その結果、メスの ST3Gal IV-KO マウスは、プレパルス抑制の阻害を示したことから、統合失調症様の症状を示すと考えられた。オスでは、有意にプレパルス抑制の阻害を示さなかったことから、性ホルモンの影響が考えられた。

本研究期間内に $\alpha 2,3$ -シアル酸転移酵素

(ST3Gal IV)の基質を見つけることはできなかった。しかしながら、 $\alpha 2,3$ -シアル酸転移酵素(ST3Gal IV)が、脳成長ホルモンの発現を制御すると共に、脂質代謝系やステロイドホルモン産生に影響することがわかった。コレステロールより生合成されるプロジェステロンは、脳内で電位依存性チャンネルや GABA_A電流を抑制し、抗てんかん薬様の作用を示すことが知られている。以上の知見は、ST3Gal IVが脳内の脂質代謝を介して、プロジェステロンを含むホルモンに作用し、神経精神活動に影響を与える可能性を提案する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Akaike N, Shin MC, Wakita M, Torii Y, Harakawa T, Ginnaga A, Kato K, Kaji R, Kozaki S. Transynaptic inhibition of spinal transmission by A2 botulinum toxin. *J Physiol.* (査読有) 2012, 591(Pt 4):1031-1043. doi: 10.1113/jphysiol.2012.242131.
2. Torii Y, Akaike N, Harakawa T, Kato K, Sugimoto N, Goto Y, Nakahira S, Kohda T, Kozaki S, Kaji R, Ginnaga A. Type A1 but Not Type A2 Botulinum Toxin Decreases the Grip Strength of the Contralateral Foreleg Through Axonal Transport From the Toxin-Treated Foreleg of Rats. *J Pharmacol Sci.* (査読有) 2011, 117:275-285. doi: 10.1016/j.toxicol.2010.10.009.
3. Okada T., Omoto-Kitao M., Mukamoto M., Nakamura J., Mino M., Kondo T., Takeshita A., Kusakabe K T., Kato K. Compensatory Renal Growth in Uninephrectomized Immature Rats: Proliferative Activity and Epidermal Growth Factor. *J Vet Med Sci.* (査読有) 2010, 72:975-980.
4. Kusakabe K T., Abe H., Kondo T., Kato K., Okada T., Otsuki Y. DNA microarray analysis in a mouse model for endometriosis and validation of candidate factors with human tissues. *J Reproductive Immunology* (査読有) *J Reprod Immunol.* 2010, 85:149-160. doi: 10.1016/j.jri.2010.02.008.

[学会発表] (計 14 件)

1. Kato K. Impaired limbic system in alpha 2,3-sialyltransferase (ST3Gal IV) deficient mice. AFLAS meeting

2012年10月10日, Bangkok 国際会議場, タイ国.

2. 加藤啓子 モデルマウスを利用した食品・治療薬スクリーニング法 イノベーション・ジャパン 2012年9月27日に地 東京国際フォーラム ホール B5.
3. 加藤啓子 モデルマウスを利用した食品・治療薬スクリーニング法 関西 8 私大新技術説明会 2012年3月16日 JST 東京別館ホール (東京・市ヶ谷)
4. 加藤啓子 てんかん及び、情動行動への脳内成長ホルモンシグナル系関与 第54回日本神経化学学会 2011年9月27日 瑠璃光, 金沢
5. 加藤啓子 てんかん及び、情動行動における脳内成長ホルモンシグナル系の関与について 第152回日本獣医学会 2011年9月19日 大阪府立大学, 大阪
6. 加藤啓子 「モデルマウスを利用した食品・治療薬スクリーニング法」次世代医療システム産業化フォーラム 2011年9月15日 大阪商工会議所, 大阪
7. 加藤啓子 ストレス障害を緩和する食品・治療薬の開発 第3回創薬シーズ相談会 「バイオスプリングボード関西」 2011年6月13日 新阪急ビル9階, 大阪
8. 加藤啓子 「京都発未来創造型産業創出連携拠点」大学シーズ説明発表会 ストレス障害を緩和する食品・治療薬の開発 2011年2月23日 京都リサーチパーク, 京都
9. 加藤啓子 シアル酸転移酵素遺伝子欠損に基づくストレス性情動系障害モデルマウスの確立 第108回 関西実験動物研究会 2010年12月10日 京都市勧業かん「みやこめっせ」
10. Kato K. Progression of epilepsy and anxiety via brain growth hormone signaling. (てんかんおよび不安障害誘導への脳成長ホルモンシグナル系の関与) Neuro2010 2010年9月4日 神戸コンベンションセンター, 神戸
11. 加藤啓子 第24回特定非営利活動法人近畿バイオインダストリー振興会議 技術シーズ公開会 「モデルマウスを利用した治療薬スクリーニング」 2010年8月27日 (財)大阪科学技術センター, 大阪
12. Kato K. Perinatal abnormality of alpha 2,3-sialyltransferase (ST3Gal IV) gene-deficient mice 第25回国際糖質シンポジウム 2010年8月5日 幕張メッセ コンベンションホール,
13. Kato K. Application of A2NTX in the treatment of refractory epilepsy (抗難治性てんかん剤としての A2NTX の開

発) 生理学会 87th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan 2010 年 5 月 20 日 Iwate Prefecture Citizen' s Cultural Exchange Center, 岩手.

14. 加藤啓子 側頭葉てんかんモデル (扁桃体キンドリング) マウスと成長ホルモン・海馬注入マウスにおける遺伝子発現比較と行動学的解析 第 57 回日本実験動物学会総会 2010 年 5 月 13 日 京都テルサ, 京都

[図書] (計 1 件)

1. Kato K. Introduction of a novel molecular mechanism on epilepsy progression: roles of growth hormone signaling in a mouse model of temporal lobe epilepsy. Underlying mechanisms of epilepsy (Ed Fatima Shad Kaneez) Intech - Epilepsy / Book 6 (査読有) p63-76.

[その他]

ホームページ等

http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~kato/Home_J.html/Welcome.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 啓子 (KATO KEIKO)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号 : 90252684